

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : **04-126074**

(43)Date of publication of application : **27.04.1992**

(51)Int.Cl.

C12N 5/06

C12M 3/00

(21)Application number : **02-242449**

(71)Applicant : **BIO MATERIAL KENKYUSHO:KK**

(22)Date of filing : **14.09.1990**

(72)Inventor : **WATANABE YOSHIAKI**

(54) SUBSTRATE FOR CULTURE OF TISSUE CELL

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a culture substrate for tissue cell enabling the culture in a state close to the culture in vivo by forming regions composed of a polysaccharide and having different cell specificities on a plastic substrate using the technique of photo-lithography.

CONSTITUTION: A pattern of a photo-resist is formed on a plastic substrate such as polysulfone, polyether sulfone, polymethylpentene and polyester. The pattern is treated with ammonia plasma and made to react with a mixed solution of a water-soluble condensation agent [e.g. 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)- carbodiimide hydrochloride] and a polysaccharide containing carboxyl group. Concrete examples of the polysaccharide are heparin, chondroitin sulfate, hyaluronic acid, alginic acid and carboxyl methyl chitin. The photo-resist is removed to obtain a culture substrate for tissue cell (e.g. hepatocyte).

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報 (A) 平4-126074

⑫ Int. Cl. 5

C 12 N 5/06
C 12 M 3/00

識別記号

序内整理番号

⑬ 公開 平成4年(1992)4月27日

Z 9050-4B
7236-4B

C 12 N 5/00

E

審査請求 未請求 請求項の数 4 (全5頁)

⑭ 発明の名称 **組織系細胞の培養に用いる基質**

⑮ 特 願 平2-242449

⑯ 出 願 平2(1990)9月14日

⑰ 発明者 渡辺 芳明 神奈川県横浜市栄区田谷町1番地 株式会社バイオマテリアル研究所内

⑱ 出願人 株式会社バイオマテリアル 神奈川県横浜市栄区田谷町1番地
研究所

⑲ 代理人 弁護士 遠山 梅一

明細書

1. 発明の名称

組織系細胞の培養に用いる基質

2. 特許請求の範囲

(1) プラスチック基質に、フォトレジストのバーンを形成し、アシモニアプラズマ処理を行った後、水溶性縮合剤とカルボキシル基を含む多糖の混液を反応させ、最後にフォトレジストを除去することにより製造されることを特徴とする組織系細胞の培養基質。

(2) プラスチック基質が、ポリスルホン、ポリエーテルスルホン、ポリメチルベンゼンまたはポリエスチルであることを特徴とする請求項第1項記載の組織系細胞の培養基質。

(3) 水溶性縮合剤が、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩またはN-シクロヘキシル-N'-(2-モルホリノエチル)カルボジイミド-バラートルエンスルホン酸塩であることを特徴とする請求項第1項記載の組織系細胞の培養基質。

(4) カルボキシル基を有する多糖が、ヘパリン、コンドロイチン硫酸、コンドロイチン、ヒアルロン酸、アルギン酸、カルボキシルメチルキチンであることを特徴とする請求項第1項記載の組織系細胞の培養基質。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、生体の組織系細胞を体外において培養しようとする際に用いる培養基質に関するものであり、細胞が外部環境を認識し接着、増殖するという細胞の機能を生かした新規培養基質に関するものである。

〔従来技術〕

組織細胞とは、例えば、肝細胞、腎細胞、筋肉細胞、皮膚細胞、血漿肉皮細胞など生体の組織を構成する細胞をいう。これに対して、血液細胞とは、浮遊状態で血管、リンパ管内を移行する好中球、单球等をいう。組織細胞は、血液細胞とは異なり一定の部位に定位し、分化し、増殖を行い機能をます。体外で培養を行う場合も同様であり、

特開平4-126074 (2)

血液系細胞は、培養液（以下培地という）中で浮遊したまま増殖するが、組織系細胞は、接着する基質がなくては増殖してこない。

培養時に用いる基質としては、通常、ガラス、東面処理したプラスチック等をそのまままたはコラーゲン、ポリリジン、フィブロネクチン等をコートして使われている。これらの基質では、その表面上に均一に細胞が接着し、増殖していく。

〔発明が解決しようとする課題〕

生体内において、細胞群は、特定の配列構造をとっており、一定にただ広がっているわけではない。それぞれの組織群の構造体となっている。この構造は、各細胞のまたは細胞群の機能と密接に結びついている。これまで用いられてきた培養基質は、基質上に均等に細胞接着が起こり、生体内で細胞のおかれている状態とは異なるものである。細胞を生体外にとり出して培養し、生体内の場合と同様の働きを実現させるためには、より生体内に近い環境を与え一定の形態なり構造体にして培養することが必要である。

成に至ったものである。

即ち、本発明は、組織系細胞を、従来の単一平面上の培養に比してより生体内に近い培養を行うことができると共に、細胞毒性の非常に少ない新規培養基質を提供することを目的とするものである。

〔課題を解決するための手段〕

このような目的を達成するための本発明の構成は、以下の(i)～(4)の技術的な事項から成るものである。

(1)プラスチック基質に、フォトレジストのパターンを形成し、アンモニアアラズマ処理を行った後、水溶性結合剤とカルボキシル基を含む多糖の溶液を反応させ、最後にフォトレジストを除去することにより製造されることを特徴とする組織系細胞の培養基質。

(2)プラスチック基質が、ポリスルホン、ポリエーテルスルホン、ポリメチルベンゼンまたはポリエチルであることを特徴とする前記(1)記載の組織系細胞の培養基質。

この方法として種々の方法が考えられるが、単なる均一な表面の培養基質ではなく、細胞の接着特異性の異なった領域を細胞レベルで形成することにより一定の形態を示させ得ることが可能と考えられた。また、細胞を培養する場合の基質は、非毒性であることが必須である。例えば、培養に用いる培地を調整する際に使う水もイオン交換、逆浸透、マイクロフィルトレーションなどの方法で不純物を極力除いた純度の高いものが必要である。つまり、培養基質の場合も同様の考慮が必要である。有害成分等の除去はいうまでもなく、細胞毒性のある表面構造も避けなければならない。

そこで、本発明者は、細胞毒性の非常に少ない天然物の多糖類を用いることを検討したところ高い有用性を示すことが判明した。また、前記の細胞特異性の違った領域の形成にはフォトリソグラフィーの手法を応用することが可能であるとの知見をした。

本発明の組織系細胞の培養に使用する培養基質は、これらの方針をさらに詳細に検討した上、完

(3)水溶性結合剤が、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩またはN-シクロヘキシル-N'-(2-モルホリノエチル)カルボジイミド-バラートルエンス酸塩であることを特徴とする前記(1)記載の組織系細胞の培養基質。

(4)カルボキシル基を有する多糖が、ヘパリン、コンドロイチン硫酸、コンドロイチン、ヒアルロン酸、アルギン酸、カルボキシルメチルキチンであることを特徴とする前記(1)記載の組織系細胞の培養基質。

本発明において、使用されるプラスチック基質は、フォトレジストをコートしてパターン形成することができる材質であればいずれの基質を用いてもよいが、フォトレジスト液に含まれる溶剤に対する耐溶剤性、レジストを乾燥する際に必要とされる熱に対する耐熱性等が必要である。また、細胞を培養した状態で銀鏡顕微鏡することができるという観点から透明性の高いものが好ましい。このようなことから、ポリエーテルスルホン、ポ

特開平4-126074 (3)

リスルホン、ポリメチルベンゼン、ポリエステル等が好適しい。形状は、フォトレジストをコートする点、細胞を培養する点から、シート状態、フィルム状態が好適しい。厚さは、特に限定されるものではないが、取扱い易さから50～1000 nm程度が好適である。

フォトレジストは、半導体業者作製用に使われている高解像度のものがすべて使用されるが、ポジ型フォトレジストであるメラックージアゾキノン型が使い易く、かつ各種から多数の品種が上市されている点で好適であるが、プラスチック基質の耐溶剤性を考慮してより適切なものを使用すればよい。

パターンの形状、幅、長さは、特に限定されるものではないが、組織系細胞の細胞間相互作用による機能発現を考慮に入れるならば、單一細胞程度の大きさでは不適当である。数十～数百μmが適当である。

フォトレジストは、スピナーフラスチック基質の耐溶剤性を考慮してより適切なものを使用すればよい。

形成する。非パターン部を露去ベーリングを行って、フォトレジストのパターンを形成する。各条件はレジスト種により異なるため、それぞれの至適条件で行う。フォトレジストのパターンを形成したプラスチック基質にアンモニアの低温プラズマ処理を行いプラスチック基質表面にアミノ基を導入する。プラズマ処理の条件は、0.01 Torr 程度に減圧したチャンバー内にアンモニアガスを導入し、0.05～0.5 Torr の圧力にして、5～100 Wの電力となるように電圧を印加し、0.1～5分処理する。13.56 MHz の高周波を用いることが望ましい。なお、プラズマ処理装置の種類、電極間距離、チャンバーの大きさ等により特性が異なるため適切な条件を選んで行えばよい。

次に、この処理基質を水溶性縮合剤とカルボキシル基を含む多糖の混液と反応させる。水溶性縮合剤は0.5～10%、カルボキシル基を含む多糖は0.1～5%が好適である。4℃～室温の温度で、10～20時間反応させる。水溶性縮合剤としては、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノ)プロピ

ル)カルボジイミド塩酸塩、またはN-エシクロヘキシル-N'-(2-モルホリノエチル)カルボジイミド-パラ-トルエンスルホン酸塩が好適である。カルボキシル基を含む多糖は、天然物、合成物等種々のものが知られている。細胞に有害な作用を与えないものが良いのは当然であるが、不純物を多く含むものや作用が不明確なものは不適当である。

また、細胞に対する特異的な接着、非接着の作用を持たないものも不適である。なぜならば、細胞に対して特異性の違った領域を作り出すことができないからである。以上の点からカルボキシル基を含む多糖として、ヘパリン、コンドロイチン硫酸、コンドロイチン、ヒアルロン酸、アルギン酸、カルボキシルメチルキチンが好適である。反応が終了したら、最後にフォトレジストの除去を行うために、エタノールまたはメタノール中に上記基質を浸漬し、超音波洗浄を行う。1～5回洗浄した後、純水でリーンスする。このようにして処理した基質は4℃のリン酸塩緩衝液中で安定に

保存することができる。

実施例1

プラスチック基質として、100 μm厚さの10cm×10cmのフィルムを用いた。材質は、ポリエーテルスルホン、ポリスルホン(いずれも住友ペーブライト社製)の2種を用いた。

このプラスチック基質に、ポジ型フォトレジストOPPR-5000(東京応化工業社製)をスピナーフラスチック基質として、100 μm厚さの10cm×10cmのフィルムを用いた。材質は、ポリエーテルスルホン、ポリスルホン(いずれも住友ペーブライト社製)の2種を用いた。露光装置NSR-1505G3A(ニコン社製)を用いて、直径50 μmの円形、パターンをフォトマスクで露光し形成した。露光時間は、150ms、現像液NHR-7(東京応化工業社製)で現像後洗浄、80℃で20分間乾燥した。この基質をプラズマ装置(サムコ社製PB-10S)を用いてアンモニアプラズマ処理した。0.01 Torr に減圧後、アンモニアガスを導入し、0.2 Torr で50W、2分処理した。

次に、この基質を、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノ)プロピル)カルボジイミド塩酸塩10%水溶液とヘパリン、ヒアルロン酸、カルボキシ

特開平4-126074(4)

メチルチキンの20%水溶液を、それぞれ混和した水溶液を反応させた。4℃で18時間反応後、純水で洗浄、そして、エタノール中に浸漬し、超音波洗浄を1回／2分で、2回行った。純水で洗浄後に、リン酸塩緩衝液中に保存した。

1cm角に上記フィルムを切ったサンプル片を12ウェルプレートに入れて組織系細胞の培養を行った。細胞は肝臓の細胞である肝四T C（ラット由来）を用い、 5×10^3 個／孔の細胞濃度の液を1孔／ウエル加え、週間培養した。培地は中性に調製したDMEM（日本製薬社製）にグルタミン（日本製薬社製）を0.3g/L、牛乳清10%、馬血清10%となるように加えたものを使用した。

培養2日目には、いずれの条件で調製した基質でも、形成したパターンと同じ培養形態をとっていることが観察された。さらに7日目には、立体的な集塊が二次元のパターンで形成されていることがみとめられ、生体内に近い培養環境となっていることが認められた。

実施例2

プラスチック基質にコロナ放電処理したポリメチルベンゼン（三井石油化学社製）、ポリエチル（東レ社製）を用い、水溶性縮合剤は、N-シアクロヘキシル-N'-(2-モルホリカルボジイミド)パラ-トルエンスルホン酸塩を、カルボキシル基を含む多糖は、コンドロイチン硫酸、コンドロイチン、アルギン酸（各シグマ社製）を用いて同様の基質を調整した。牛大動脈より採取した血管内皮細胞（皺代3代）を、DMEM/F12培地（シグマ製）に10%となるよう牛乳清血清を添加した培地で実施例1と同様に培養したところいずれの基質も多糖により形成された形態どおりに細胞が培養されていることが認められた。

(発明の効果)

本発明の基質を用いて組織系細胞の培養を行うと、その細胞の培養形態が明確に制御される。

従来の单一平面上の培養に比してより生体内に近い培養を行うことができ、細胞の機能研究、あるいは分化の調導、形態形成等に非常に有用なものであり、産業上の利用性も大きなものがある。

以下、実施例により本発明とさらに具体的に説明する。

弁理士 遠山俊一

平成補正書

平成3年6月10日

特許庁長官 植松敏殿

1. 事件の表示

特願平2-242449号

2. 発明の名称

組織系細胞の培養に用いる基質

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

横浜市栄区田谷町1番地
株式会社バイオマテリアル研究所
代表取締役 中原恒雄

4. 代理人 〒105 東京都港区虎ノ門1丁目9-10
港電ビル TEL 508-0878
(6045) 弁理士 遠山俊一

5. 補正命令の日付

平成3年5月14日（発送日）

6. 補正の対象

代理権を承認する書面 明細書

6. 補正の内容

別紙の通り



(別紙)

明細書中、誤字がありましたので下記の通り補正します。

2. 特許請求の範囲

(1)プラスチック基質に、フォトレジストのパターンを形成し、アンモニアプラズマ処理を行った後、水溶性縮合剤とカルボキシル基を含む多糖の混液を反応させ、最後にフォトレジストを除去することにより製造されることを特徴とする組織系細胞の培養基質。

(2)プラスチック基質が、ポリスルホン、ポリエーテルスルホン、ポリメチルベンテンまたはポリエステルであることを特徴とする請求項第1項記載の組織系細胞の培養基質。

(3)水溶性縮合剤が、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩またはN-シクロヘキシル-N'-(2-モルホリノエチル)カルボジイミドーバラートルエンスルホン酸塩であることを特徴とする請求項第1項記載の組織系細胞の培養基質。

(4)カルボキシル基を有する多糖が、ヘパリン、

ヌ酸塩」を「カルボジイミドーバラートリエンスルホン酸塩」と訂正。

同頁5行、10行「前記(1)記載」を「前記(1) 種記載」と訂正。

第7頁8行「すべて使用されるか、」を「すべて使用できるが、」と訂正。

第10頁11行「露光し成形し」を「露光し形成し」に訂正。

第11頁8行「肝臓の細胞である。H₄TG」を「肝臓の細胞株である「H₄TG」」と訂正。

同頁下から4行「～な塊が」を「～な細胞集塊が」と訂正。

第12頁4行「(2-モルホリ/カルボジイミド～」を「(2-モルホリ/エテルカルボジイミド～」と訂正。

同9行「DME_E/P12」を「DME_M/12」と訂正。

第13頁1行～2行「以下、実施例により本発明とさらに具体的に説明する。」を削除します。

特開平4-126071(5)

コンドロイチン硫酸、コンドロイチン、ヒアルロン酸、アルギン酸、カルボキシルメチルキチンであることを特徴とする請求項第1項記載の組織系細胞の培養基質。

2頁14行「組織細胞とは、」を「組織系細胞」に訂正。

2頁15行「血管内皮細胞」を「血管内皮細胞」と訂正。

同頁14行「組織細胞とは、」を「組織系細胞」に訂正。

同頁下から9行～2行「組織細胞は直液細胞とは異なり一定の成長に定在し、分化し、増殖」を「組織系細胞は直液系細胞とは異なり一定の部位に定在し、分化、増殖」と訂正。

明細書第8頁4行「通常、カラス」を「通常、ガラス」と訂正。

同頁下から3行「働きを発させるためには、」を「働きを現わせるためには、」と訂正。

第5頁下から2行「前記(1)記載の」を「前記(1) 種記載の」に訂正。

第6頁4行「カルボジイミドーバラートルエン